

S/N unknown

PATENT

11033 U.S. PRO
09/785904
02/16/01

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Lee et al. Serial No.: unknown
Filed: concurrent herewith Docket No.: 12777.8US01
Title: A METHOD FOR DETECTING MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY
PCR AMPLIFICATION REP 13E12 REPEATED SEQUENCE

CERTIFICATE UNDER 37 CFR 1.10

'Express Mail' mailing label number: EL650062905US

Date of Deposit: February 16, 2001

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service 'Express Mail Post Office To Addressee' service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

By: Brant Miles
Name: Brian Maher Brant Miles

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

Applicants enclose herewith one certified copy of a Korean application, Serial No. 10-2000-7984, filed February 19, 2000, the right of priority of which is claimed under 35 U.S.C.

§ 119.

Respectfully submitted,

MERCHANT & GOULD P.C.
P.O. Box 2903
Minneapolis, Minnesota 55402-0903
(612) 332-5300

By DPM
Douglas P. Mueller
Reg. No. 30,300

Dated: February 16, 2001

DPM./hjh

J1033 U.S. PTO
09/785904
02/16/01

대한민국특허청
KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2000년 제 7984 호
Application Number

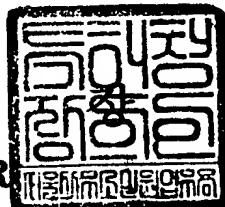
출원년월일 : 2000년 02월 19일
Date of Application

출원인 : 주식회사 바이오제니아 외 1명
Applicant(s)



2001 01 04
년 월 일

특허청
COMMISSIONER



【서류명】	출원인명의변경신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.09.20
【구명의인】	
【성명】	이태윤
【출원인코드】	420000044141
【신명의인】	
【성명】	주식회사 바이오제니아
【출원인코드】	120000401521
【신명의인】	
【성명】	이태윤
【출원인코드】	420000044141
【대리인】	
【성명】	남호현
【대리인코드】	919980001635
【포괄위임등록번호】	20000346518
【포괄위임등록번호】	20000487396
【사건의 표시】	
【출원번호】	1020000007984
【출원일자】	2000.02.19
【심사청구일자】	2000.02.19
【발명(고안)의 명칭】	알이피 13 01 12 반복서열의 피시알 증폭을 이용한 결핵균 의 검출방법
【변경원인】	일부양도
【취지】	특허법 제38조제4항 ·실용신안법 제20조 ·의장법 제24조 및 상표법 제12조제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다 .
【수수료】	13000
【첨부서류】	인감증명서 1통 양도증 1통

1020000007984

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.02.19
【발명의 명칭】	알이피 13 01 12 반복서열의 피시알 증폭을 이용한 결핵균 의 검출방법
【발명의 영문명칭】	A method for detecting <i>Mycobacterium tuberculosis</i> by PCR amplification of REP13E12 repeated sequence
【출원인】	
【성명】	이태윤
【출원인코드】	4-2000-004414-1
【대리인】	
【성명】	남호현
【대리인코드】	9-1998-000163-5
【발명자】	
【성명】	이태윤
【출원인코드】	4-2000-004414-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김성광
【성명의 영문표기】	KIM, SUNG KWANG
【주민등록번호】	410316-1037818
【우편번호】	705-035
【주소】	대구광역시 남구 대명5동 317-1 영남의대 미생물학 교실
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이종석
【성명의 영문표기】	LEE, JONG SEOK
【주민등록번호】	661105-1674414
【우편번호】	705-035
【주소】	대구광역시 남구 대명5동 317-1 영남의대 미생물학 교실
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이재열
【성명의 영문표기】	LEE, JAI YOUL

1020000007984

【주민등록번호】	500722-1162415		
【우편번호】	702-010		
【주소】	대구광역시 북구 산격동 1370번지		
【국적】	KR		
【신규성주장】			
【공개형태】	간행물 발표		
【공개일자】	1999.08.31		
【심사청구】	청구		
【핵산영기 및 아미노산 서열목록】			
【서열개수】	006		
【서열목록의 전자문서】	첨부		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 남호현 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	7	면	7,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	5	항	269,000 원
【합계】	305,000 원		
【감면사유】	개인 (70%감면)		
【감면후 수수료】	91,500 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 위임장_1통 3. 신규성(출원시 의 특례)규정을 적용받기 위한 증명서류_1통 [1999년8 월 3 일자 연구개발용역 결과보고서]		

【요약서】**【요약】**

본 발명은 REP13E12 반복서열의 PCR(polymerase chain reaction) 증폭을 이용한 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*)의 검출방법에 관한 것으로, 특히 REP13E12 반복서열의 전부 또는 일부에 대한 PCR 증폭을 통하여, 임상가검물내 결핵균을 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 한국에서 분리된 결핵균주로부터 클로닝된 반복서열인 REP13E12를 증폭하는 PCR에 의한 결핵균 검출방법은 우수한 민감도 및 특이도를 나타내는 바, 가검물내 결핵균을 효율적으로 검출할 수 있다.

【대표도】

도 3

【색인어】

REP13E12 반복서열, PCR 증폭, 임상가검물, 결핵균의 검출, 민감도와 특이도

【명세서】**【발명의 명칭】**

알이피13E12 반복서열의 피시알 증폭을 이용한 결핵균의 검출방법{A method for detecting *Mycobacterium tuberculosis* by PCR amplification of REP13E12 repeated sequence}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 REP13E12의 구조유전자를 나타내는 제한효소지도이다.

도 2는 REP13E12 혼성화용 프로브를 이용하여 다양한 항산균을 대상으로 서던 블로팅(Southern blotting)한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 3은 REP13E12 증폭을 위한 PCR(REP13E12-PCR)의 결핵균 특이성을 조사하기 위하여, 여러 가지 균주를 대상으로 PCR한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<4> 본 발명은 REP13E12 반복서열의 PCR(polymerase chain reaction) 증폭을 이용한 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)의 검출방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 REP13E12 반복서열의 전부 또는 일부에 대한 PCR 증폭을 통하여, 임상가검물내 결핵균을 높은 민감도를 가지고 특이적으로 검출하는 방법에 관한 것이다.

<5> 결핵은 전 세계 인구의 1%인 약 17억명이 감염되어 있고, 매년 800백만명 정도의 새로운 환자가 발생하며, 이중 34%인 270만명이 사망하는 매우 심각한 감염성 질환이다. 우리 나라에는 약 70만명의 결핵환자가 있는 것으로 추정되고 있으며, 매년 14만명의 새로운 환자가 발생하며 5천명이 결핵으로 사망하는 것으로 보고되어 아직도 심각한 보건 문제로 남아 있다.

<6> 결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의하여 야기되는 만성 감염성 질환으로, 최근에는 후천성면역결핍증(AIDS)의 합병증으로서 우리 나라 뿐만 아니라 전세계적으로도 유병율이 증가하고 있는 추세이다. 또한, 최근의 결핵균들은 결핵의 치료약제들에 대하여 다중내성을 가지는 것들이 많아 더욱 치료에 어려움을 주고 있다.

<7> 따라서, 결핵의 퇴치를 위하여는 신속한 진단법의 개발과 더불어 새로운 치료약제의 개발, 분자 역학적인 연구 및 백신에 관한 연구 등 다각적인 노력이 요구된다. 이 중 가장 우선되는 것 중의 하나가 신속한 진단법의 개발이다. 결핵균은 매우 천천히 성장하므로 환자의 가검물을 배양하여 균을 동정하기에는 1~2개월의 오랜 기간이 소요된다. 보다 신속히 가검물내 결핵균의 존재를 규명하여 조기에 치료를 시작하려는 목적으로 PCR 등의 핵산증폭을 이용하는 방법이 사용되고 있다. PCR을 위하여는 증폭할 표적 DNA의 염기서열이 필요하며, 이는 결핵균에 특이하며 사람의 DNA에는 존재하지 않는 것이라야 한다. 이러한 결핵균 특이 염기서열은 지금까지 여러 연구자들에 의하여 보고되었다.

<8> 결핵균 검출을 위한 PCR에 사용되는 가장 대표적인 염기서열은 결핵균에만 특이한 삽입서열(insertion sequence, 이하 'IS'라 함)인 IS6110이다. IS6110은 1358bp의 크기를 갖는 삽입서열로서, 그 양 말단에는 30bp의 대칭반복배열(inverted repeat)을

가지며, 결핵균 계놈 내에 보통 0 내지 20개의 장소에 삽입되어 있고, 그 삽입되어 있는 위치 및 숫자가 결핵균 균주마다 다른 것으로 알려져 있다. 따라서, IS6110은 다른 결핵균 특이 염기서열에 비하여 PCR을 이용한 결핵균의 검출에 있어서 매우 유용한 표적이 되어, PCR을 위한 프라이머의 고안에 많이 사용되어 왔다.

<9> 그러나, 최근 들어 IS6110을 갖지 않거나 적은 복제(copy)수만을 가지는 결핵균들도 존재함이 보고됨에 따라, 이러한 경우 PCR에 의한 결핵균의 검출은 또 다른 대상 염기서열을 필요로 하게 되었다. 이를 위하여는 기존에 발표된 결핵균 특이 염기서열들 중 하나를 사용할 수도 있으나, 이들은 한국에서 분리된 결핵균주들 혹은 한국의 결핵환자 가검물을 대상으로 그 결핵균 특이성이 검증된 바가 없는 실정이다.

<10> 따라서, 한국에서 PCR을 이용한 결핵균의 검출을 위하여는 한국에서 분리된 결핵균주들을 유전적으로 분석하고, 이들 중 공통적으로 존재하면서도 결핵균내에서만 발견되는 염기서열을 한국 결핵균 분리주의 DNA로부터 발견하여, 이를 근거로 한 프라이머를 고안하는 것이 가장 이상적이라 할 수 있을 것이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 이에, 본 발명자는 한국 결핵균 분리주로부터 신규한 453bp의 반복서열을 발견하여 그 염기서열을 결정하였는데(참조: Lee, T.Y. et al., *Tubercle Lung Dis.*, 78:13-19(1997); 서열번호 2), 이 반복서열은 결핵균 복합체(*Mycobacterium tuberculosis* complex)에만 특이적으로 존재함을 알 수 있었으며, 또한 이 서열은 결핵균 표준균주 H37Rv의 전체 계놈내에 3개 존재하는 REP13E12(1393 bp) 반복서열의 일부라는 것이 나중에 밝혀졌다(참조: Cole S.T. et al., *Nature*, 393:537-544(1998); 서열번호 1). 이를 바탕으로 새로운 특정 PCR 프라이머를 고안하고 결핵균 환자의 임상가검물을

을 대상으로 하여 PCR 증폭시켰을 때, IS6110을 증폭할 수 있는 프라이머를 사용한 PCR 증폭 결과와 동등하거나 보다 우수한 민감도를 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

<12> 결국, 본 발명의 목적은 REP13E12의 PCR 증폭을 이용한 임상가검물내 결핵균의 검출방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<13> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

<14> 본 발명에서는 결핵이 의심되어 내원하는 환자들로부터 가검물(주로 객담)을 채취한 다음, 이를 임상가검물로부터 1) 항산성 염색(acid-fast stain)을 시행하여 결핵균을 분리·동정하고, 대량 배양하여 2) 각 결핵균주들의 게놈 DNA를 분리하고 3) 서던 블로팅(Southern blotting)을 위하여 IS6110 및 REP13E12 프로브를 제작·정제하여 표지하며 4) 서던 블로팅으로 각 반복서열들이 결핵균주의 게놈내에 존재하는 복제수를 확인한다. 아울러, 5) 비드비팅(bead beating) 법을 이용하여 임상가검물로부터 결핵균의 DNA를 추출하고, IS6110 증폭을 위한 PCR(IS6110-PCR) 및 REP13E12 증폭을 위한 PCR(REP13E12-PCR)을 수행하여, 그 결과를 상기한 염색 및 배양 결과와 비교·분석한다.

<15> 그 결과, REP13E12에 근거한 가검물내 결핵균의 PCR 검출은 기존의 염색, 배양법 및 IS6110-PCR법 등과 비교하여, 적어도 동등하거나 더 우수한 민감도 및 특이도를 나타

내었다. 따라서, REP13E12-PCR법은 높은 효율성을 갖고 가검물내 결핵균 검출에 유용하게 사용될 수 있다.

<16> 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

<17> [실시예 1] 가검물의 처리 및 일차배양

<18> 모든 실험적 조작은 균 오염으로 인한 위양성(false positive) 결과를 최소화시키기 위하여, 실험실의 다른 장소와 분리된 살균 장치(laminar flow clean bench) 내에서 멸균 처리된 시약과 용기를 사용하여 실시하였다.

<19> 결핵이 의심되는 환자들로부터 객담을 수집하고, 그 검체에 4% NaOH를 동량으로 첨가하여 충분히 혼합시킨 다음, 상온에서 20분간 정치하였다. 그런 다음, 균의 부력을 상쇄 및 농축시키기 위하여, 0.067M 인산 완충용액(pH 6.8)을 2.5배 용적으로 첨가하여 섞은 후 3,000 x g에서 20분간 원심분리하였다. 상층액은 따로 준비한 폐액통(70% 에탄올 함유)에 버리고, 침전물에는 폐놀 레드(phenol red, pH 지시약)를 1방울씩 점적하고 시료가 노란색으로 변화할 때까지 1N HCl을 소량씩 첨가하여 중화시킨 다음, 0.2% 소혈청알부민 분획 V(bovine serum albumin fraction V)를 1

ml 첨가하여 시료를 균질화시켰다. 그런 다음, 균질화된 시료에 대하여 한편으로는 항산성 염색을 시행하고, 다른 한편으로는 오가와(Ogawa) 고체배지에 접종하여 결핵균을 배양하였다. 또한, 나머지 균질화된 시료는 PCR 분석을 위해 -20°C에 보관하여 사용하였다.

<20> 시료의 결핵균을 1차 배양하기 위하여, 투브에 준비된 2% 오가와 배지의 표면에 상기의 균질화된 시료 100 μ l 씩을 골고루 펴주어 접종하고, 투브의 뚜껑을 느슨하게 하면서 수평으로 위치시켜, 37°C 배양기에서 24시간 배양하여 균을 배지 위에 착상시킨 다음, 뚜껑을 꼭 잡그고 수직방향으로 위치시켜 배양하면서 균의 성장을 관찰하였다. 접종 후 첫 2주까지는 매일 균의 성장을 관찰하였고, 그 이후에는 3일 간격으로 8주까지 관찰하였다.

<21> 배양과정에서 결핵균 이외의 신속성장 일반세균에 의한 오염이 의심스러운 경우, 예를 들면 육안으로도 곰팡이에 의한 오염이 확인된 경우는 장비와 다른 시료로의 오염을 방지하기 위해, 발견 즉시 분리하여 가압증기멸균하여 제거한 다음, 배양기와 배양용기를 5% 페놀 용액으로 닦아 멸균시켰다. 오염이 의심되거나 신속성장 항산균인지 타균에 의한 오염인지의 구분이 육안으로 구분하기 어려운 경우는 항산성 염색을 실시하여, 항산균인 경우는 균종의 확인을 위하여 계속 두면서 액체배양까지 실시하였으며, 항산균이 아닌 경우는 곰팡이와 동일한 방법으로 폐기처분 및 멸균 처리하였다.

<22> [실시예 2] 항산성 염색

<23> 가검물은 0.5% N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine)이 첨가된 2% NaOH로 일반세균의 오염을 제거한 다음, 4,000 x g로 5분간 원침하여 균을 농축하고 이를 항산성 염색 후 현미경으로 관찰하였다. 항산성 염색은 Ziehl-Neelsen 방법에 따라 시행하였다. 염색 결과는 CDC(Center for Disease Control) 지수로 나타내었으며, 검경을 100 field 이상 실시한 다음 음성으로 판정하였다(장축으로 3회, 단축으로 9회 이상)

<24>

※CDC지수

<25>

1~2/300시야 : (±) 1~9/100시야 : (1+)

<26>

1~9/10시야 : (2+) 1~9/시야 : (3+)

<27>

>9/시야 : (4+)

<28> [실시예 3] 결핵균의 배양

<29>

먼저, 실시예 1의 고체배지에서 성장한 균은 항산성 염색으로 항산균임을 확인하였다. 분리 균주들의 보관과 실험을 위해 충분한 양을 확보하여야 하므로, ADC(Albumin fraction V:bovine, Dextrose and Catalase; Difco사, USA)가 포함된 Middlebrook 7H9 액체배지(Difco사, USA)에 실시예 1의 오가와 고체배지로부터 균을 한 백금이 취하여 접종하고, 100 rpm 정도로 가볍게 흔들어 주면서 35~37°C에서 4주 이상, 균량이 충분할 때까지 배양하였다. 이때, Middlebrook 7H9 액체배지는 증류수 900ml 당 Middlebrook 7H9 배지 분말을 4.7g 용해시키고 가압 증기멸균한 다음, 이와 별도로 가압 증기멸균한 글리세롤 2 ml를 첨가하여 혼합하고, 여기에 Middlebrook ADC를 10 ml 첨가하여 제조하

였다.

<30> 상기와 같이 배양된 균은 3,000 x g로 20분간 원침하여 균을 수집한 후, 일부는 보존을 위하여 Brucella broth와 15% 글리세롤을 첨가하여 -70°C에 보관하였고, 나머지 는 각종 실험을 위하여 -20°C에 보관하여 사용하였다.

<31> [실시예 4] 서던 블롯팅을 위한 결핵균 게놈 DNA 분리

<32> 실시예 3에서 대량 배양한 결핵균을 수집하고 75°C에서 20분간 방치하여 균을 약 독화시킨 다음 DNA 분리에 사용하였다. 우선, -70°C에서 균을 열렸다 녹인 다음 리소자 임(lysozyme)을 2 mg/ml의 농도로 가하여 37°C에서 1시간 방치하였다. 이어, 1% SDS 및 1 mg/ml의 단백질가수분해효소 K(proteinaseK)를 가한 후, 55°C에서 48시간 방치하였다. 단백질가수분해효소 K의 억제제인 페닐메틸суль포닐플루오라이드 (phenylmethylsulfonylfluoride)를 0.04 mg/ml 함유하는 TE 완충용액으로 55°C에서 30분 간 2회 세척하였다. 그런 다음, 동량의 클로로포름-이소아밀알코올 혼합용액 (chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1(v/v))을 가하고 잘 혼합한 다음, 원침하여 상층 액을 취하고 0.6배 용적의 이소프로판올을 가하여 게놈 DNA를 침전시켰다

<33> [실시예 5] PCR 분석을 위한 결핵균 DNA 분리

<34> PCR에 의한 결핵균 검출의 대상이 되는 임상가검물로부터 DNA를 분리하기 위하여

는 간단한 과정이면서도 PCR 반응에 저해를 주는 인자가 없어야 할 것이므로, 물리적으로 세포를 파쇄하고 페놀/클로로포름/이소아밀알코올의 혼합용액(페놀:클로로포름:이소아밀알코올 = 25:24:1(v:v), 이하 'PCI'라 함)으로 DNA를 추출하는 비드-비팅(bead-beating)법에 의해 DNA를 분리하였다. 먼저, 객담 등의 임상가검물을 4M NaOH로 용해시켜 함유되어 있는 점액성분을 최소화시킨 후, 원침하여 내부에 들어 있을 수 있는 결핵균을 수집하였다. 상층액을 제거하고 증류수에 들어 있는 0.1 mm 직경의 지르코니움 비드(zirconium bead, Biospec Products사, USA) 100 μ l 를 가하였다. 이어, 증류수 100 μ l 와 PCI 100 μ l 를 가한 후, 미니-비드 비터(mini-bead beater, Biospec Products사, USA)를 사용하여 3분간 진탕하고, 12,000 rpm으로 원심분리하여 수용상의 상층(upper aqueous phase)을 분리하여

<35> 1/5용적의 5M NaCl 및 1/8 용적의 10%세틸메틸암모니움 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide)-0.7 M NaCl을 가한 다음, 65°C에서 10분간 방치하였다. 동량의 PCI로 처리하고 수용상(aqueous phase)을 걷어 내어, 0.6배 용적의 이소프로판올을 가하고 DNA를 침전시켰다. 이 침전 DNA를 적절한 양의 멸균증류수에 용해시켜 -20°C에 보관하면서 PCR에 사용하였다.

<36> [실시예 6] 서던 블롯팅

<37> [실시예 6-1] IS6110을 이용한 서던 블롯팅 프로브 DNA 준비

<38> 결핵균 특이 염기서열 IS6110의 일부인 245 bp DNA를 PCR로 증폭하여 프로브로 사

용하였다. 그의 증폭을 위한 프라이머 염기서열 및 PCR 반응은 후술하는 실시예 7에서 기술한 방법과 동일하였다. 증폭된 단편은 8% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 분리하여, 245 bp 크기의 DNA를 'crush and soak'법으로 37°C에 방치한 다음, DNA를 용출하고 페놀 처리로 DNA를 정제, 에탄올 침전하여 프로브DNA로 사용하였다.

<39> [실시예 6-2] REP13E12를 이용한 서던 블롯팅 프로브 DNA 준비

<40> REP13E12에 속하는 453 bp의 반복서열을 포함하고 있는 플라스미드 pIS116(참조: Lee, T.Y. et al., *Tubercle Lung Dis.*, 78:13-19(1997))을 *NaeI*으로 절단하여, 430 bp의 단편을 실시예 6-1과 동일한 방법으로 분리 및 정제하였다. 도 1은 REP13E12의 구조 유전자를 나타내는 제한효소지도이다. 도 1에서, *rfbB* 및 *rfbC*는 람노즈(rhamnose) 생합성 유전자의 일부를 나타내고, 프로브는 상기에서 PCR 증폭된 서던 블롯팅용 프로브 DNA를 나타낸다.

<41> [실시예 6-3] 프로브 표지

<42> 상기에서 분리 및 정제한 프로브용 DNA는 DIG DNA 표지 및 검출 키트(Boehringer Mannheim사, Germany)를 사용하여 표지하였다. 즉, 정제한 프로브 DNA 15 μ l 를 끓는 물에 10분간 두어 DNA를 단일가닥으로 변성시킨 후, 30초간 얼음에 두고 2 μ l 의 dNTP 혼합물을 섞은 다음, 1 μ l 의 클레노우 단편(Klenow fragment)을 가하여 37°C에서 16시간 이상 반응시켜 표지하였다. 이어, 2 μ l 의 EDTA(0.2 M, pH 8.0)와 2.5 μ l 의 4M LiCl을 첨가하고 에탄올 침전시켜 사용하였다.

<43> [실시예 6-4] 서던 혼성화

<44> 실시예 4에서 분리된 결핵균 게놈 DNA를 *Pvu*II로 절단하고, 두 개의 0.8% 아가로스 젤에서 전기영동하였다. 전기영동은 트리스-아세테이트-EDTA 완충용액에서 40 V의 일정전압으로 8 내지 10시간 동안 실시하였다. 젤을 에티디움 브로마이드 용액 내에 적정시간 방치하여 염색한 후, 자를 대고 사진을 찍고 다음과 같이 서던 블롯팅을 시행하였다.

<45> 젤을 변성용 완충용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 15분간 방치한 후, 중화용 완충용액(3 M NaCl을 포함한 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5)에 30분 이상 방치하였다. 젤 내의 DNA는 나일론 막 필터(Amersham International사, UK)에 옮긴 후 건조시키고, 80°C에서 2시간 동안 방치하여 DNA를 막에 고정시켰다. 이어, 42°C에서 2시간 동안 혼성화(hybridization)용액(5 × SSC, 50% 포름아마이드, 0.1% N-라우로일사르코신(N-lauroylsarcosine), 0.02% SDS, 2% 차단시약(blocking reagent))에서 예혼성화(prehybridization)시킨 후 용액을 버리고, 5분 동안 끓여 단일가닥으로 변성시킨 프로브(상기 실시예 6-3에서 제조된 프로브)를 혼성화 용액에 첨가한 용액을 예혼성화 용액과 교체하여 1시간 이상 반응시켰다. 그런 다음, 2배 농도의 세척용 완충용액(2 × SSC, 0.1% SDS)으로 상온에서 5분간 2회 세척하고, 55°C에서 0.5배 농도의 세척용 완충용액(0.5 × SSC, 0.1% SDS)으로 15분간 2회 세척한 다음, 차단용액(1% 차단시약을 포함한 말레산 완충용액)을 막이 잠길 만큼 첨가한 후 1시간 동안 방치하였다. 이어, 차단용액에 항-DIG-알칼라인 포스파타제를 5000배로 희석하여 30분간 반응시킨 후, 검출을 위한 세척용 완충용액(500 ml 말레산 완충용액 당 1.5 ml)으로 15분간 2회 세척하여 결합하지

않은 여분의 항-DIG-AP를 제거하고, 10 ml의 검출용 완충용액(0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂을 포함한 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5)에 45 μ l 의 NBT(4-nitro blue tetrazolium chloride) 용액과 35 μ l 의 X-포스페이트를 첨가하여 실온 암소에서 발색시켰다.

<46> 도 2는 실시예 6-3에서 제조된 REP13E12 혼성화용 프로브를 이용하여 다양한 항산균을 대상으로 서던 블로팅한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다. 도 2에서 보듯이, REP13E12 프로브는 결핵균 복합체(*Mycobacterium tuberculosis* complex)에 속하는 균주에만 특이적으로 존재함을 알 수 있었으며, 또한 균주에 따라 3~4개의 복제수가 존재함을 알 수 있었다.

<47> [실시예 7] PCR

<48> 결핵균 특이 PCR은 한국산 결핵균으로부터 클로닝된 453bp의 반복서열(Lee, T.Y. et al., *Tubercle Lung Dis.*, 78:13-19(1997) 참조; 이는 결핵균 표준균주 H37Rv의 REP13E12 반복서열(서열번호 1)의 일부분에 해당; 서열번호 2)을 근거로 한 프라이머 p6/p7(서열번호 3 및 4) 및 기존에 사용되고 있는 IS6110을 근거로 한 결핵균 특이 프라이머 INS-1/INS-2(서열번호 5 및 6)를 사용하였다.

<49> PCR 반응혼합액은 10 mM Tris-HCl(pH 8.8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X-100, 0.5 mM의 상기 각 프라이머들, 200 mM의 dNTPs 및 2.5 유닛(unit)의

Taq 중합효소(DyNaZyme, Finland)를 함유하였으며, 여기에 1 ng의 주형 DNA를 첨가하여, 총 용적이 50 μ l 되게 한 다음 PCR을 시행하였다. 반응 중의 수분증발을 방지하기 위하여 반응혼합액에 미네랄 오일을 한방울씩 점적하였다. PCR 온도순환은 97°C에서 10분, 60°C에서 2분 및 72°C에서 3분을 1회; 96°C에서 1분, 60°C에서 2분 및 72°C에서 3분을 30회; 96°C에서 1분, 60°C에서 2분 및 72°C에서 10분을 1회 시행하였다.

<50> dNTP에는 dTTP 대신 dUTP를 사용하고, PCR 반응혼합액에 우라실(uracil) DNA N-글리코실라제 1 유닛을 가하고 50°C에서 10분간 방치하여 앰플리콘(amplicon)을 파괴한 후 PCR을 시행하였다.

<51> 도 3은 REP13E12-PCR의 결핵균 특이성을 조사하기 위하여, 여러 가지 균주를 대상으로 PCR한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다. 도 3에서, x502는 한국인 결핵환자의 객담에서 분리한 결핵균을 나타낸다. 도 3에서 보듯이, REP13E12-PCR의 예상 밴드인 234 bp의 밴드가 결핵균 복합체에 속하는 균주들에서만 관찰됨을 알 수 있었다. 따라서, REP13E12를 증폭하는 PCR은 결핵균 복합체에 특이적임을 확인하였다.

<52> 상술한 실시예 1 내지 실시예 7에 따라, 한국인 결핵환자로부터 수집한 가검물(객담)을 대상으로 항산성 염색, 배양, IS6110-PCR 및 REP13E12-PCR에 의한 결핵균의 존재를 조사하고 비교하였다(참조: 표 1).

<53> 표 1: 항산성 염색, 배양, IS6110-PCR 및 REP13E12-PCR에 의한

<54> 가검물내 결핵균 검출 결과

1020000007984

<55>	그룹	균주*	시료의 수	염색결과	배양결과	PCR 결과	
						IS6110	REP13E12
I	Tb	72	+	+	+	+	+
	Tb	10	-	+	+	+	+
II	Tb	2	+	-	+	+	+
	Tb	1	-	-	+	+	+
III	Tb ^a	3	+	-	+	-	-
	Tb ^a	5	+	-	-	-	+
IV	MOTT	3	+	+	-	-	-
	MOTT	1	-	+	-	-	-
V	FP	1	-	-	+	-	-
	MOTT ^b	14	+	-	-	-	-
VI	세균	156	-	-	-	-	-
VII	무						

<56> Tb : *M. tuberculosis*<57> Tb^a : *M. tuberculosis*의 존재 가능성이 있음

<58> MOTT : Mycobacteria other than tubercle bacilli

<59> MOTT^b : Mycobacteria other than tubercle bacilli의 존재 가능성이 있음

<60> FP : IS6110 PCR에 의한 위양성 결과가 있음

<61> 상기 표 1에서 보듯이, 그룹 I에서는 염색결과와는 무관하게 결핵균이 배양되었고, 2가지 PCR(IS6110-PCR 및 REP13E12-PCR) 모두에서 결핵균 DNA가 검출되었으며, 총 82개의 가검물이 여기에 속하였다. 그룹 II에서는 염색결과와 관계없이 결핵균은 배양되지 않았고, IS6110-PCR 및 REP13E12-PCR 모두에서 결핵균 DNA가 검출되었으며, 총 3개의 가검물이 여기에 속하였다. 그룹 III에서는 IS6110-PCR 또는 REP13E12-PCR 중 하나에서만 결핵균 DNA가 검출되었고, 결핵균은 배양되지 않았으나 염색결과 항산균이 검출되

어, 본 실험에서 사용한 반복서열의 결핵균 특이성으로 보아 결핵균의 존재가 강력히 추정되는 경우로서 총 8개의 가검물이 여기에 속하였다. 이상의 3가지 그룹들은 결핵균이 가검물내에 존재하는 그룹으로 간주되어 추후의 결과분석에 고려되었다.

<62> 반면에, 그룹IV에서는 염색결과와 무관하게 균 배양은 되었으나 배양된 균들의 집락이 결핵균과는 다른 양상을 보이며 2가지 PCR 모두에서 음성으로 나온 경우로서, 이들 4개의 균주들은 MOTT인 것으로 생각되었다. 그룹 V에서는 다른 모든 검사에서는 음성이나 IS6110-PCR에서만 양성으로 나온 경우로서, 총 1개의 가검물이 여기에 속하였는데, PCR의 위양성인 것으로 생각되었다. 다른 모든 검사에서 음성이나 REP13E12-PCR에서만 양성인 경우는 관찰되지 않았다. 또한, 그룹 VI에서는 모든 검사에서 음성이나 염색결과에서만 항산균의 존재가 판명된 경우로서, 총 14개의 가검물이 여기에 속하였다. 그룹 VII에서는 모든 검사법에서 결핵균 혹은 항산균이 존재하지 않는 것으로 나타난 경우로서, 총 156개의 가검물이 여기에 속하였다.

<63> 이러한 검사결과들을 바탕으로 하여 각 검사법들의 결핵균 검출에 있어서의 민감도, 특이도, PPV(positive predictive value) 및 NPV(negative predictive value)를 분석하여, 하기 표 2에 나타내었다. 이때 결핵균이 가검물에 존재하는 것으로 기준을 삼은 것은 상기 표 1에서와 같이 그룹 I에서 그룹 III까지의 총 93개 가검물로서, 이들을 소위 결핵균 양성의 시료(golden positive standard)로 잡고서 분석하였다. 그리고, 결핵균 음성의 시료(golden negative standard)가 되는 가검물들은 상기 표 1의 그룹 IV에서 그룹 VII까지의 총 175개이었다.

<64> 표 2 : 배양 및 염색 결과와 비교한 PCR 결과의 민감도, 특이도 분석

<65>	실험종류 및 결과	시료의 수		민감도 (%)	특이도 (%)	PPV (%) ^a	NPV (%) ^b
		양성	음성				
염색							
양성		82	17	88.2	90.3	82.8	93.5
음성		11	158				
배양							
양성		82	4	88.2	97.7	95.3	94.0
음성		11	171				
IS6110-PCR							
양성		88	1	94.6	99.4	98.9	97.2
음성		5	174				
REP13E12-PCR							
양성		90	0	96.8	100	100	98.3
음성		3	175				

<66> 상기 표 2에서 보듯이, 염색이나 배양법 보다는 PCR법이 민감도 측면에서 월등히 우수함을 알 수 있었으며, 이는 기존의 연구결과들에서 알려진 바와 같았다. 두 가지 PCR법을 비교하면, REP13E12-PCR이 다소 우수한 듯이 보이나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 또한, 상기 표 2에서 민감도를 볼 때 염색결과와 배양결과에서 동일하게 나타났는데, 이는 염색결과는 결핵균 이외의 항산균들이 존재하여도 양성으로 나오기 때문이며, 이에 크게 기여한 경우들이 그룹 VI이었다.

<67> 특이도 측면에서는 예상대로 염색보다는 배양법이 우수하였다. 한편, 특이도면에서 PCR법보다 우수한 것으로 보고되었던 배양법에서 특이도가 다소 낮게 나온 것은 MOTT 4주(그룹 IV)의 결과가 포함되어 있기 때문으로, 조금만 숙련된 사람이 배양한다면 배양법의 특이도는 100%라고 할 수 있다. PCR법의 경우 대부분 위양성이 큰 문제로 지적되고 있으나, 본 실험에서는 IS6110-PCR에서만 한 예에서 위양성이 나왔을 뿐으로, 2가지 PCR법 모두 매우 우수한 특이도를 나타내는 것으로 확인되었다.

<68> 한편, PPV란 어떤 검사법으로 양성으로 판정한 경우 실제 양성으로 볼 수 있는 확

률이고, NPV란 음성으로 판정한 경우 실제 음성으로 볼 수 있는 확률로서, PPV 및 NPV 모두 배양법보다는 PCR법이 우수하였으며, REP13E12-PCR법이 IS6110-PCR법보다 약간 우수하였다.

<69> 따라서, 본 발명에서 처음으로 그 효용성을 검토한 REP13E12-PCR법은 IS6110-PCR 법과 비교하여 적어도 동등하거나 더 우수한 민감도, 특이도, PPV 및 NPV를 가지고, 가검률 내 결핵균 검출에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

<70> 이상에서 살펴본 바와 같이 본 발명에 의하면, 한국에서 분리된 결핵균주로부터 클로닝된 반복서열인 REP13E12를 증폭하는 PCR에 의한 결핵균 검출방법은 우수한 민감도 및 특이도를 나타내는 바, 가검률내 결핵균을 효율적으로 검출할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

결핵균 복합체(*Mycobacterium tuberculosis* complex)에만 특이적으로 존재하는 REP13E12 반복서열의 전부 또는 일부에 대한 PCR(polymerase chain reaction) 증폭을 이용하는 결핵균의 검출방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,
REP13E12 반복서열은 서열번호 1에 해당하는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 결핵균의 검출방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서,
REP13E12 반복서열의 일부에 대한 PCR 증폭은 서열번호 2를 근거로 하여 고안된 프라이머쌍에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 결핵균의 검출방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서,

결핵균은 한국에서 분리된 결핵균주 혹은 한국인 결핵환자의 가검물에서 분리한 균주인것을 특징으로 하는 결핵균의 검출방법.

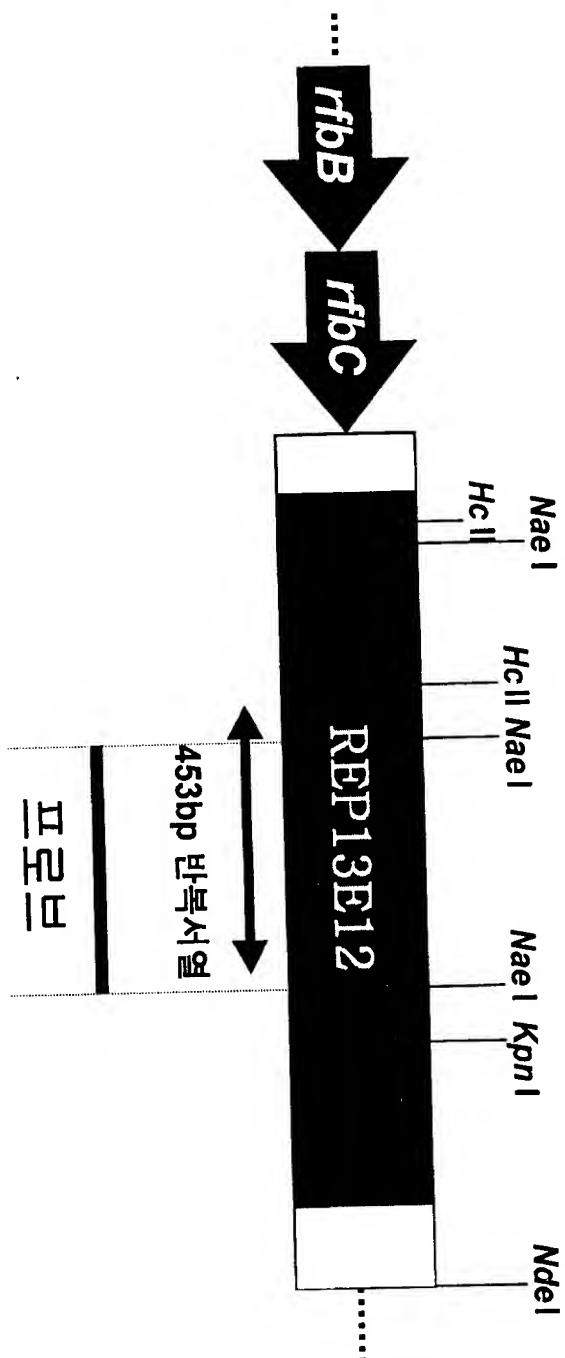
【청구항 5】

제 3항에 있어서,

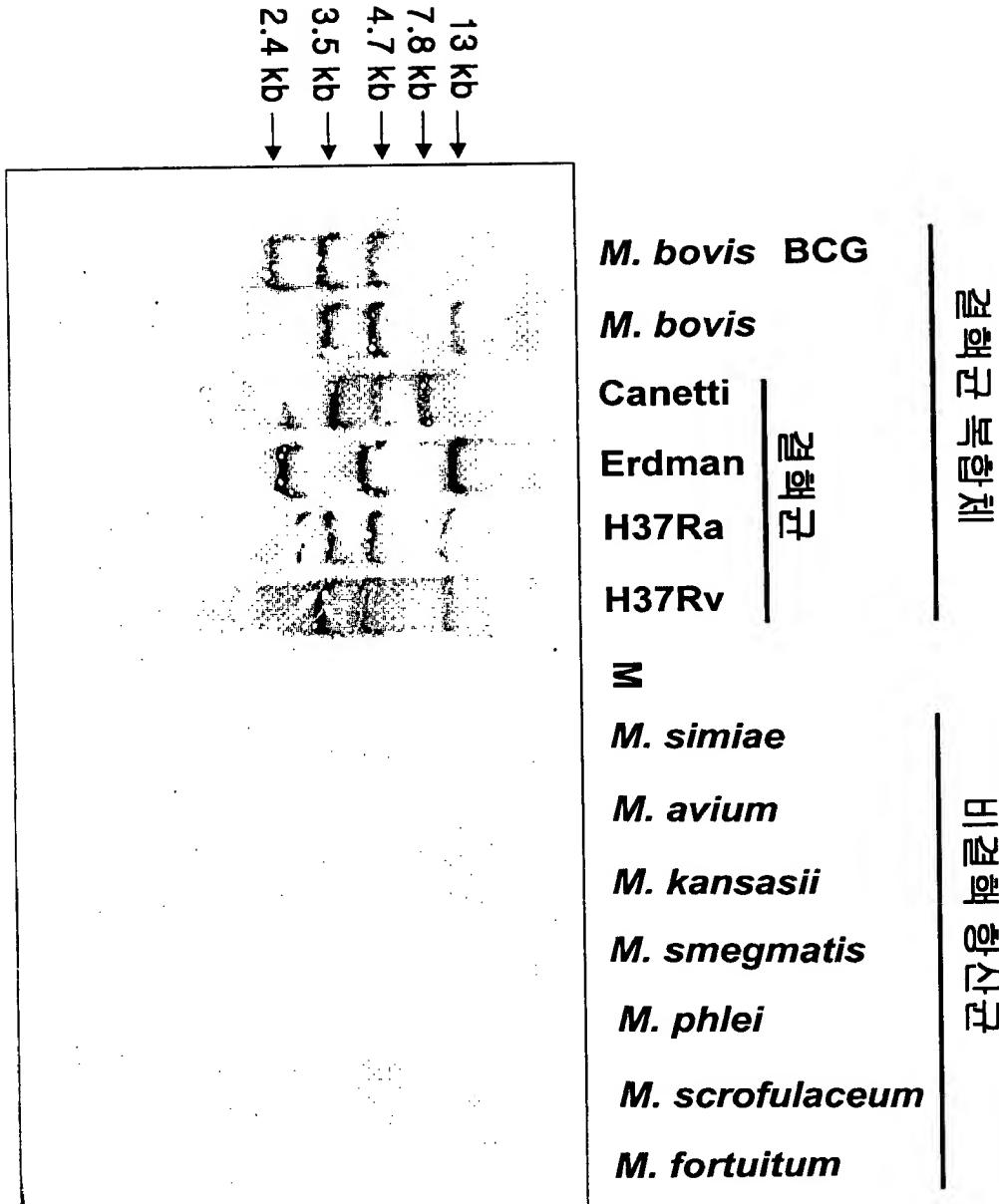
프라이머쌍은 서열번호 3 및 4인 것을 특징으로 하는 결핵균의 검출방법.

【도면】

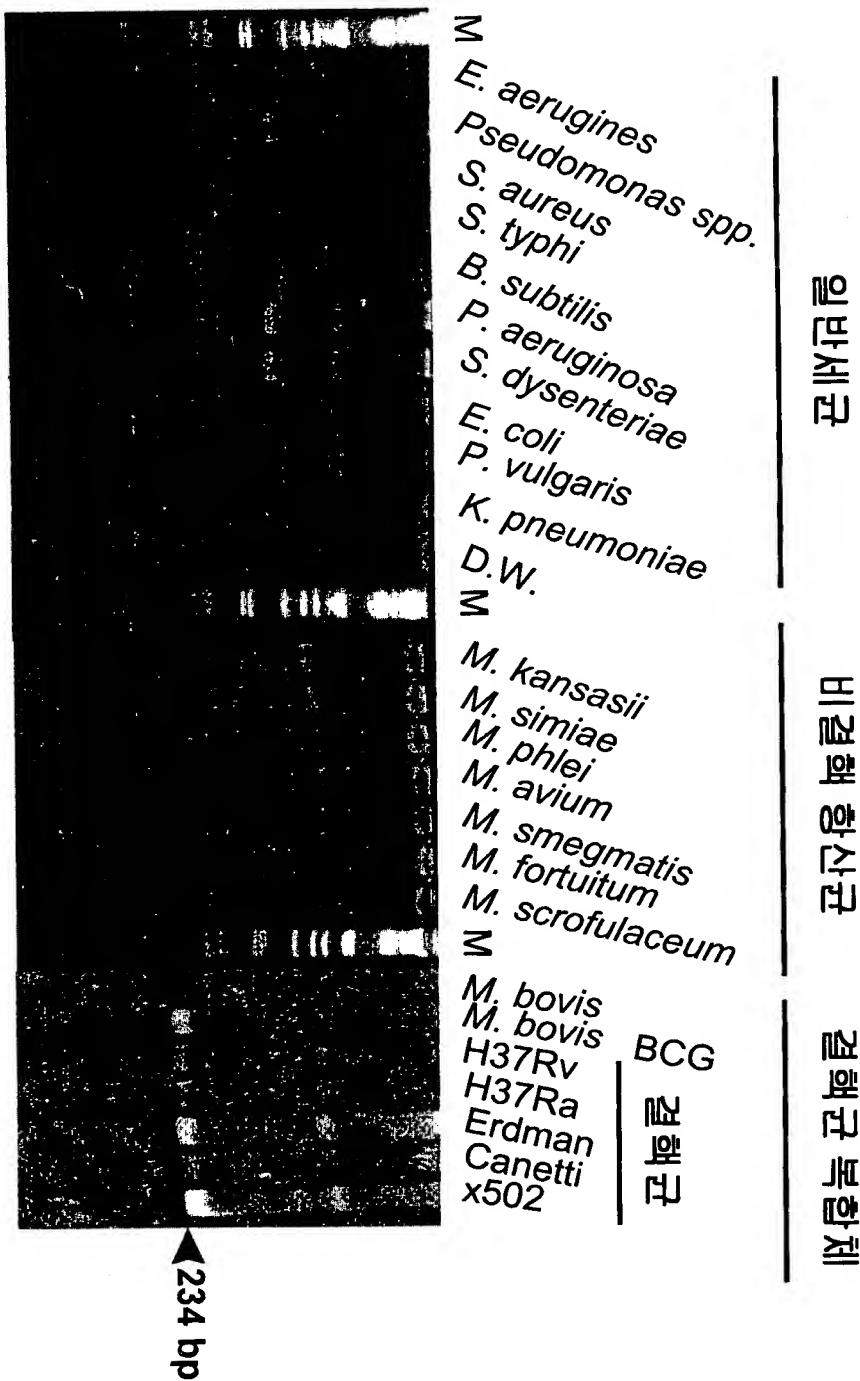
【도 1】



【도 2】



【도 3】



【서열목록】

<110> LEE, TAE YOON <120> A method for detecting *Mycobacterium*
 tuberculosis by PCR amplific ation of REP13E12 repeated sequence <160>

1020000007984

2001/1/

6 <170>; KOPATIN 1.5 <210>; 1 <211>; 1393 <212>; DNA
<213>; Mycobacterium tuberculosis <400>; 1 tggttcggg tagccgcgaa
cgattgtcg aggtcttga tgcgctggat gccgagctgg 60 accgcttggaa cgaggtgtct tttgaggtg
taccacccc agaacggctg cggtctctgg 120 aacgtctggaa atgcttggtg cgccggctac cggcggtg
tcacgcgttg atcaaccaac 180 ttgacgccc agccagcgag gaagaactgg gcggcacgct gtgctgcgc
ctggccaacc 240 gttacgcat caccaagccc gacgcccggc ggcgcacatcgcc cgacgcccggc gatctcgga
300 ctcgtcgagc actcaccggt gaaccgctag ccccacagtt gaccgcccacc gccaccggcc 360
aacgccaggg cctgatcgcc gaggcgacg tcaaagtgtat tcgcgcctt tttcgcccac 420 ctgcccggc
cggtggatgt gtccacccgc caggccggcg aagccgaccc ggccggcaaa 480 gccgctcaat atcgcccc
cgagctggcc cgctacgccc agcgggtcat ggactggcta 540 caccggacg gcgacccac cgacaccga
cgcccccgc aacgcggcat caccctgagc 600 aaccagcaat acgacggcat gtcacggcta agtggctac
tgaccccca agcgcgggcc 660 accttgaag ccgtgctagc ccaaactggcc gccccggcg cgaccaacc
cgacgaccac 720 accccggta tcgacaccac ccccgatgac ggcgcacatcg accgcgacac ccgcagcca
780 gccaacgca accacgacgg gctgctggcc gggctgcgcg cgctgatcgcc ctccggaa 840
ctggccaac acaacggct tcccgatcg atcggtca ccaccaccct gaccgaccc 900 caaaccggc
cgggcaaggg cttcaccggc ggcggcaccc tgctaccat ggccgatgtg 960 atccgcatga ccagccacg
ccaccactac tccccggcaaa gcgggaggta ccccgaggcg 1020 atcttcgacc acggcacacc cctggcgct
tatcacaacca aacgcctagc ctcccccggcc 1080 cagcggatca tgctgttcgc caacgaccgc ggctgcacc
aaccggctg tgacgcaccg 1140 gcctaccaca gccaagccc ccacgtcacc gcctggacca gcaccggac
caccgacatc 1200 accgagctga ccctggcctg cggcccccac aaccgactcg ccgaaaaagg ctggaccac
1260 cacaacaaca cccacggcca caccgaatgg ctaccaccac cccacctcga ccacggccaa 1320

1020000007984

2001/1

ccccgcacca acaccttcca ccacccgaa cgattcctcc acaaccaaga cgacgacgac 1380 aaacccgat
gac 1393 <210> 2
<211> 453 <212> DNA <213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 2 gatggcgag ggcacatca aagtgattcg cgccctttt cgcccacctg cccgcccgg
60 tggatgtgtc cacccgccag gccggcaag ccgacctgcc ggcaaaggcc tcaatatcg 120
cccgacgagc tggcccgcta cgcccagcgg gtcatggact ggctacaccc cgacggcgcac 180 ctcaccgac
ccgaacgcgc cgcacaaacgc gcatcaccct gagcaaccag caatacgacg 240 gcatgtcacg gctaagtgg
tacctgaccc cccaagtcgc gggccaccc tgaagccgt 300 ctagccaaac tggccgcccc cggcgcgac
aaccggacg accacacccc ggtcatcgac 360 accaccccg atgcggccgc catcgaccgc gacacccgc
gccaagccca acgcaaccac 420 gacgggctgc tggccggct ggcgcgcctg atc
453 <210> 3 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> Single stranded oligonucleotide primer
<400> 3 acatcaaagt gattcgcg
18 <210> 4 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> Single stranded oligonucleotide primer
<400> 4 catgccgtcg tattgctg
18 <210> 5 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> Single stranded oligonucleotide primer
<400> 5 cctgcgagcg taggcgtcgg t
21 <210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> Single stranded oligonucleotide primer

1020000007984

2001/1/

<400> 6 ctcgtccagc gccgcttcgg

20